TPMT*3Cのジェノタイプ検出 −SNP Typing Kitの使用経験−

島根大学医学部附属病院薬剤部　西村 信弘

はじめに

アザチオプリンや6−メルカプトプリン（6MP）の代謝酵素であるThiopurine S-methyltransferase（TPMT）はPhaseⅡの 代謝酵素であり、酵素活性に影響があるとされる10数種類の遺伝子多型が報告されています[1]。その中で、日本人においてはTPMT*3CとTPMT*6の変異アレルの存在が報告されています[2)~4)]。そのアレル頻度は1%前後ですが、日本人の有する変異アレルのほとんどはTPMT*3Cです。

臨床において、血液悪性腫瘍の治療の維持療法として6MPを用いられる際には、副作用の発現予測、酵素活性の低下に対する用量調節、酵素の欠損では代替え治療への転換など、予後に影響を与える因子への迅速な対処が必要不可欠であります。最近、米国FDAは小児血液悪性腫瘍において6MPを投与する場合にはTPMTのジェノタイプ検出を義務づける方針を示しました。このような背景から、TPMTのジェノタイピングは、6MPを適正に使用する上で非常に有用な手法であり、日本人のTPMT酵素活性の低下を予測するためにはTPMT*3Cのジェノタイプ検出が必要であると考えられます。一方、ジェノタイプ検出を臨床の場で実施するためには、簡便かつ正確に判定できる検出法が必要とされます。そこで、kit製品である本製品の臨床での応用を試みたので報告いたします。

方　法

試　　料：小児患者2例のゲノムDNA（遺伝子解析に関する文書による説明および同意を取得している）

ＤＮＡ抽出：患者全血からドナクイックⅡ【大日本製薬株式会社製】を用いてゲノムDNAを抽出しました。

試　　薬：SNP Typing Kit Thiopurine methyltransferase*3C*（719A→G）

ＰＣＲ反応：キット添付の取扱説明書に従ってサーマルサイクラーを使用してPCR反応を実施しました。

装　　置：i-Cycler【BioRad社】

ＰＣＲ条件：95℃、 5 min
↓
95℃、30 sec ←
65℃、30 sec　35cycles
72℃、30 sec ←
↓
72℃、 2 min

検　　出：PCR産物の検出は電気泳動により行いました。

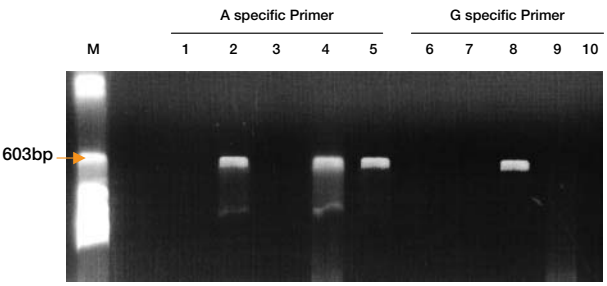
装　　置：ミューピット【コスモバイオ社】

ゲル濃度：アガロースゲル2%

結果及び考察

TPMT*3Cアレルの検出を実施した結果、PCR産物は電気泳動において増幅産物長（608 bp）の単一バンドとして検出されました（Fig.1）。これは、野生型（A）および変異型（G）の特異的プライマーがそれぞれの標的とするアレルのみを増幅していることを示し、ダイレクトシークエンスの結果と一致しました（図2）。これらの結果より、SNP Typing Kit TPMT*3Cにより特異性の高い変異の検出が可能であることが確認されました。

以上の結果より、検出に必要な装置を有している施設においては、血液採取日の内に結果が得られるため、臨床においては非常に有用であることが明らかとなりました。また、ポジティブコントロールが提供されていることから、正確なジェノタイプ検出が可能であります。また、特異性の高い変異の検出が可能であるkitを使用することにより、従来、確認のために行っていたダイレクトシークエンスの必要性は低くなるものと考えられます。



Lane M: *Hae*Ⅲ digest
Lane 1, 6: negative control (Water)
Lane 2, 7: TPMT*1/*1
Lane 3, 8: TPMT*3C/*3C
Lane 4, 5, 9, 10: Patient DNA

図1．ASP-PCR detection for TPMT*3C

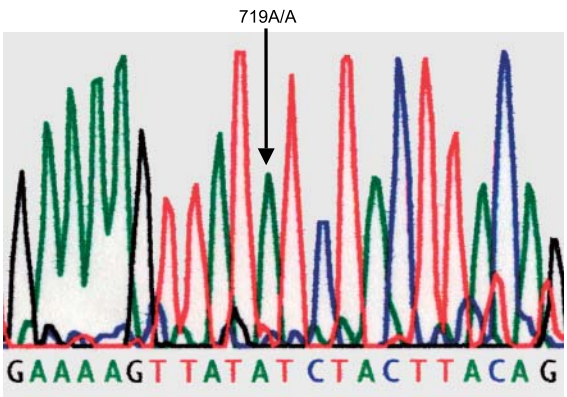


図2．Electropherogram (sense strands) for the *TPMT* gene at exon 10. Wild/wild (A719A). Sequence was determined using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

参考文献

1）Krynetski EY *et al., Pharmacology*, **61**：136-146（2000）
2）Hiratsuka M *et al., Biol Pharm Bull.*, **23**：1090-1093（2000）
3）Hiratsuka M *et al., Mutat Res.*, **448**：91-95（2000）
4）Ando M *et al., Pharmacogenetics*, **11**：269-273（2001）

（保存温度：-20℃）

品名及び内容	包装	Code No.	価格
SNP Typing Kit Thiopurine methyltransferase *3C*（719 A→G）	200回用	STK-151	¥40,000

関連商品

（保存温度：-20℃）

品名及び内容	包装	Code No.	価格	2004～2005 総合カタログ
**SNP Typing Kit N-Acetyltransferase *2*5*　（481 C→T）	200回用	STK-131	¥40,000	-
**SNP Typing Kit N-Acetyltransferase *2*6*　（590 G→A）	200回用	STK-132	¥40,000	-
**SNP Typing Kit N-Acetyltransferase *2*7*　（857 G→A）	200回用	STK-133	¥40,000	-
**SNP Typing Kit Glutathion-S-transferase A1　（-69 C→T）	200回用	STK-141	¥40,000	-
**SNP Typing Kit Alcohol dehydrogenase *2*2*（47Arg→His）	200回用	STK-161	¥40,000	-
**SNP Typing Kit Aldehyde dehydrogenase *2*2*（487G→A）	200回用	STK-162	¥40,000	-
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*2*（2850 C→T）	200回用	STK-121	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*4*（1846 G→A）	200回用	STK-122	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*5*（whole deletion）	200回用	STK-123	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*10*（100 C→T）	200回用	STK-124	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*14*（1758 G→A）	200回用	STK-125	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*21*（2573 C insert）	200回用	STK-126	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*36*（Exon9 2D6→2D7）	200回用	STK-1277	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6 Duplicate*（2D6 ×2）	200回用	STK-128	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2C9*3*（1075 A→C）	200回用	STK-101	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2C19*2*（681 G→A）	200回用	STK-111	¥40,000	4-47
**SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2C19*3*（636 G→A）	200回用	STK-112	¥40,000	4-47

※各試薬には専用のPositive Control Setをご用意しております。タイピングの精度確認にご使用ください。
（価格は各¥20,000、Code No.は上記記載の各商品Code No.の末尾にPがつきます。）

※PCR（Polymerase Chain Reaction）は、F.Hoffmann-La Roche社が米国特許（特許番号4,683,195および4,683,202）を有しております。PCRの実施にあたっては許可が必要となります。本品はF.Hoffmann-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。